

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/059322 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
G01N 33/68, C12Q 1/37

12, rue des Pierres Plantées, f-69001 Lyon (FR). DUPIN, Marilyne [FR/FR]; Chatanay, f-69670 Vaugneray (FR). PERRON, Hervé [FR/FR]; 4, allée de la Guignonière, f-69290 Saint-Genies-Les-Ollières (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003857

(74) Mandataire : BREESE, Pierre / MAJEROWICZ, Marc; Breesé-Majerowicz, 3 Avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
19 décembre 2003 (19.12.2003)

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale

(30) Données relatives à la priorité :  
02/16383 20 décembre 2002 (20.12.2002) FR

(48) Date de publication de la présente version corrigée :  
14 juillet 2005

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE  
DES ALIMENTS-AFSSA- [FR/FR]; 27-31 avenue  
du Général Leclerc, f-94701 Maisons-Alfort (FR).  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-  
ENTIFIQUE-CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,  
f-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE CLAUDE  
BERNARD LYON [FR/FR]; 43, boulevard du 11  
Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR).  
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy-l'Etoile (FR).

(15) Renseignements relatifs à la correction:  
voir la Gazette du PCT n° 28/2005 du 14 juillet 2005, Sec-  
tion II

(72) Inventeurs; et

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MOUSSA, Aly [FR/FR]; 52, chemin du Grand Revoyet, f-69600 Oullins (FR). COLEMAN, Anthony, William [GB/FR]; 55, rue de Margnolles, F-69300 Villeurbanne (GB). SHAHGALDIAN, Patrick [IR/FR]; 223, rue André Philip, f-69003 Lyon (IR). DA SILVA, Eric [FR/FR]; 20, rue Camille Roy, f-69007 Lyon (FR). MARTIN, Ambroise [FR/FR]; 605c, route du Bas Privas, f-69390 Charly (FR). LAZAR, Adina, Nicoleta [RO/FR]; Résidence Benjamin Delessert, Chambre 312, 145, avenue Jean Jaurès, f-69007 Lyon (RO). LECLERE, Edwige [FR/FR];

A1

(54) Title: PRP DETECTION METHOD USING AN ANCILLARY MACROCYCLIC LIGAND

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE LA PRP UTILISANT UN LIGAND ADJUVANT MACROCYCLIQUE.

(57) Abstract: The invention relates to a method of detecting pathogenic forms of the prion responsible for transmissible subacute spongiform encephalopathies. The inventive method is characterised in that an ancillary macrocyclic ligand (AML) which is free or bound to a support is added to a biological sample that may contain PrP<sup>sc</sup>, the resulting suspension is reacted with an anti-PrP<sup>sc</sup> antibody and the presence of PrP is detected.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection des formes du prion pathogènes responsables des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP<sup>sc</sup>, un ligand adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP<sup>sc</sup>, et on détecte la présence de PrP.

WO 2004/059322 A1

**PROCEDE DE DETECTION DE LA PRP UTILISANT UN LIGAND ADJUVANT MACROCYCLIQUE.**

La présente invention concerne un procédé de détection des formes du prion pathogènes responsables des 5 encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles.

La protéine prion native ou normale, désignée PrP ou PrP<sup>c</sup> pour la protéine prion cellulaire, est une glycoprotéine largement exprimée dans les cellules lymphoides et neuronales des mammifères.

10 Des changements conformationnels de PrP<sup>c</sup> conduisent à l'apparition et à la propagation de la protéine pathogène PrP<sup>sc</sup> qui est résistante à la protéinase K. Cette protéine pathogène peut être appelée PrP<sup>sc</sup> ou PrP<sup>res</sup> indifféremment. L'accumulation de PrP<sup>sc</sup> dans les organes des animaux est à 15 l'origine de nombreuses maladies et notamment de la tremblante des petits ruminants, de la maladie cachectisante chronique (ou chronic wasting disease 'CWD') de l'élan et de l'antilope, de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) chez l'homme.

20 L'apparition tardive après une période d'incubation de 2 à 6 ans et le lent développement des symptômes chez le bétail infecté par l'ESB a considérablement ralenti le développement de modèles épidémiologiques. L'ESB est transmissible par ingestion à l'homme et a conduit à 25 l'apparition d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeld-Jakob (vMJC).

La détection de la protéine pathogène PrP<sup>sc</sup> est difficile chez les animaux infectés sains avant le développement de la maladie et surtout dans le sang et 30 l'urine chez les animaux malades. Il est à présent établi que la PrP<sup>sc</sup> présente chez les animaux destinés à l'alimentation humaine se transmet à l'homme lors de l'ingestion des tissus infectés. Un objectif majeur de santé

publique est donc d'éviter cette transmission en détectant la présence de la PrP<sup>sc</sup> :

- chez des animaux destinés à la consommation humaine en vue de les retirer de la chaîne alimentaire,

5 - dans les dons de sang et dérivés sanguins destinés à la transfusion chez l'homme. En effet, comme le montre une présence de protéine pathogène PrP<sup>sc</sup> dans le sang et les liquides lymphoïdes bien avant l'atteinte cérébrale, et donc bien avant la possibilité de déceler des signes 10 neurologiques évocateurs de maladie à prions cliniquement déclarée, la physiopathologie chez l'homme est méconnue et, ne pouvant réaliser des infections expérimentales comme chez le mouton, l'absence de test de détection dans le sang ou d'autres fluides biologiques ne permet pas de l'étudier et 15 donc de prévenir une transmission interhumaine par don de sang, ou de traiter les personnes infectées avant que les lésions cérébrales n'aient débuté ; et

- dans les troupeaux animaux avant le stade neurologique, permettant ainsi d'éliminer les animaux 20 infectés précocement, avant arrivée aux abattoirs.

La détection de la présence de PrP<sup>sc</sup> dans des échantillons biologiques ou chez des animaux devient donc d'une extrême importance et plusieurs équipes de chercheurs développent des méthodes de détections immunologiques 25 (WO02/086511). Par ailleurs, des méthodes pour complexer à la PrP<sup>sc</sup> des peptides, des petites molécules ou des inhibiteurs en vue du traitement de vMJC font l'objet de recherches actives. Toutefois, les méthodes en l'état de la technique se heurtent sans arrêt à la difficulté 30 d'identifier la PrP<sup>sc</sup> de manière fiable lorsqu'elle est en faible quantité dans un échantillon biologique, et notamment dans les fluides biologiques.

La présente invention a donc pour objet un procédé permettant de détecter la protéine PrP et notamment PrP<sup>sc</sup> à

des dilutions où elle n'est pas détectable avec les méthodes utilisées actuellement, cette détection étant d'une fiabilité de 100 % sur les 119 échantillons testés par les inventeurs. Avantageusement, le procédé selon l'invention 5 permet d'amplifier d'un facteur 4 la détection de la PrP<sup>sc</sup>.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup>, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP, un ligand 10 adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP, puis on identifie la présence de PrP.

La liaison du ligand macrocyclique au support peut être mise en œuvre de façon connue de l'homme du métier, 15 telle que par adsorption ou liaison covalente, la liaison covalente, autrement appelée greffage, étant préférée.

Lorsqu'on cherche à détecter la PrP<sup>sc</sup>, la présente invention peut également comprendre l'étape supplémentaire de traitement de l'échantillon avec de la protéinase K avant 20 ou après contact avec l'AML.

La présence de PrP peut être mise en œuvre par détection de la réaction anticorps anti-PrP/PrP, et ce par tout moyen connu de l'homme du métier, et notamment par méthode sandwich telle que ELISA, immunoblotting, immuno 25 micro-cantilever détection, spectrométrie de masse ou par des analyses optiques et spectroscopiques. L'identification du complexe AML-PrP s'effectue au moyen de techniques de balayage profilométrique telles que la microscopie à réflectance de balayage, la microscopie de balayage en champ 30 proche ou la microscopie de balayage confocale.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'échantillon biologique provient d'un animal, y compris l'homme. De préférence, cet échantillon provient du cerveau, des tissus du système nerveux central, ou des organes, et

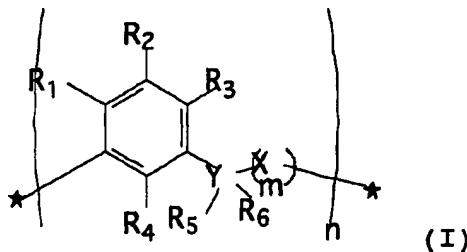
notamment la rate ou l'intestin. Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, cet échantillon est un fluide biologique, notamment le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

5 Par ligand macrocyclique, on entend un composé capable de se lier à la PrP, et en particulier à la PrPsc et qui est constitué d'une succession de cycles formant un macrocycle. Les ligands macrocycliques sont connus de l'homme du métier. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer les 10 cyclophanes, les métacyclophanes, les cyclodextrines, les cyclo(tétra-acides chromotropiques), les sphérands et les cyclo[n]vératrylènes.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique est capable de se lier à des sites contigus, ou proches dans 15 l'espace, de sites de liaison avec un anticorps et a pour action d'augmenter la liaison anticorps-PrP<sup>sc</sup>.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des métacyclophanes. Parmi les métacyclophanes, les *para*-sulfonato-calix-arènes 20 fonctionnalisés sur la face phénolique sont particulièrement avantageux. Ces composés peuvent être obtenus suivant la méthodologie décrite dans Da Silva et al., *J. Supramol. Chem* 1, (2001), 135-138.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique 25 répond à la formule générale (I) ci-dessous,



dans laquelle

$R_1$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

5  $R_2$  représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol,  $CH_2Pol$ , dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

10  $R_3$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

$R_4$  représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe  $OCH_2R$  ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

15 Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

$R_5$  et  $R_6$ , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement  $CH_2$ , ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

20  $R_5$  et  $R_6$  représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement  $CH_2$  ou un atome d'oxygène ou de soufre,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

25 R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

30 les substituants  $R_1$  à  $R_6$ , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

Ainsi, le composé de formule (I) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle benzénique, et les substituants de ce

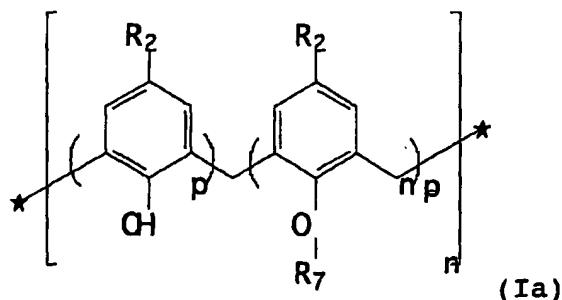
cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Les ligands macrocycliques peuvent être préparés selon les techniques connues de l'homme du métier, par exemple 5 décrites dans *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon, Oxford, 1996.

Les chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, ramifiées ou non, cycliques ou non cycliques, substituées ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou 10 non polaires, sont largement connues de l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer les alkyles, les alcènes, les aryles et les cycles saturés tels que le cyclohexane. Un exemple de groupement non polaire est CF<sub>3</sub>, et des exemples de groupements polaires sont les substituants Pol tels que 15 définis précédemment.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, le ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessus, et plus précisément à la formule générale (Ia) ci-dessous

20



dans laquelle

chaque groupement R<sub>2</sub>, pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

25 R<sub>7</sub> est un groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-Z dans lequel Z est un groupement COOEt, COOH, CN ou NH<sub>2</sub>,

r est un entier compris entre 1 et 20,

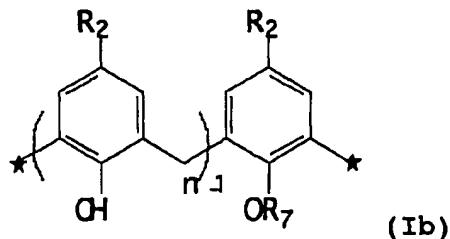
p est un entier compris entre 1 et 10,

n est un entier compris entre 2 et 10.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le ligand adjvant macrocyclique est le p-sulphonato-calix-[4]-arène, le p-sulphonato-calix-[6]-arène, le p-sulphonato-calix-[8]-arène, ou l'un de leurs dérivés.

Suivant un second mode de réalisation de l'invention, le ligand adjvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessus, et plus précisément à la formule générale (Ib) ci-dessous

10



dans laquelle n est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement R<sub>2</sub>, pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

15 R<sub>8</sub> représente un groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(CO)<sub>s</sub>-(NH<sub>2</sub>) ou un groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-COOH où t est un entier compris entre 0 et 6 et s est un entier compris entre 0 et 6.

20 Avantageusement, le calix-arène de formule (Ib) est tel que les deux groupements R<sub>2</sub> sont chacun un groupement sulfate, n est 4, 6 ou 8, et R<sub>8</sub> est un atome d'hydrogène, un groupement CH<sub>2</sub>COOH, un groupement CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> ou un groupement CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

25 De préférence, le calix-arène de formule (Ib) est tel que tel que les deux groupements R<sub>2</sub> sont chacun un groupement sulfate, n est un entier égal à 6, et R<sub>8</sub> est un groupement (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, le ligand selon l'invention est greffé sur un support solide. Ce support est fonctionnalisé par une

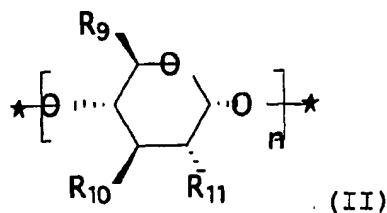
fonction susceptible de former une liaison avec une fonction portée par le ligand. Suivant un mode de réalisation préféré, le support solide est fonctionnalisé par une liaison NHS (N-hydroxysuccinimide) ou par une fonction NH<sub>2</sub>.

5 Cette fonction peut réagir avec une fonction portée sur le ligand. Dans ce mode de réalisation, les calix-arènes portant une fonction susceptible de réagir pour former une liaison avec la liaison fonctionnelle du support solide, notamment les calix-arènes portant une liaison NH<sub>2</sub> ou COOH,

10 sont particulièrement préférés.

L'invention a également pour objet un ligand adjuvant macrocyclique greffé sur un support fonctionnalisé, dans lequel le ligand répond à la formule (Ib) telle que définie ci-dessus, dans laquelle n est un entier compris entre 4 et 15, et le support est du type support solide de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH<sub>2</sub> et est de préférence une bille magnétique ou une microplaquette. Un tel greffage préserve l'interaction ultérieure entre la protéine et le ligand, ainsi que la présentation stéréochimique de 20 l'épitope pour la détection par un anticorps anti-PrP, les sites ciblés par le greffage sur le support étant différents de ceux qui servent à l'interaction avec la PrP.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la 25 famille des cyclodextrines et en particulier des cyclodextrines répondant à la formule générale (II)



dans laquelle

R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement CH<sub>2</sub>, OH, OR, OCOR, COR, CH<sub>2</sub>Pol, OCH<sub>2</sub>R, SR, NR, Pol et R étant ci-dessous définis,

R<sub>10</sub> et R<sub>11</sub>, chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupement CH<sub>2</sub>, OH, OR, OCOR, COR, CH<sub>2</sub>Pol, OCH<sub>2</sub>R, Pol et R étant ci-dessous définis,

Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium ou acide carboxylique,

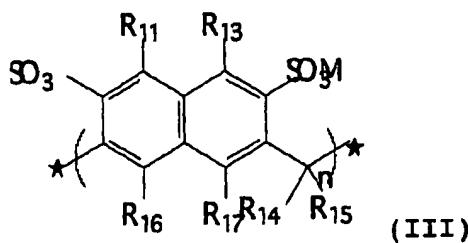
R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 6 et 8,

les substituants R, à R<sub>11</sub> peuvent être de nature différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (II) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les substituants de ce cycle peut être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Selon une variante de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des cyclo-tétra-acides chromotropiques, et en particulier aux cyclo-tétra-acides chromotropiques répondant à la formule générale (III)

25



dans laquelle

$R_{12}$  et  $R_{13}$ , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe R ou Pol tels que définis ci-dessous,

5  $R_{14}$  et  $R_{15}$ , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène, un groupement  $CH_2$ , ou un groupe R tel que défini ci-dessous, ou bien

$R_{14}$  et  $R_{15}$  représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

10  $R_{16}$  et  $R_{17}$ , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ou un groupe OR,  $OCH_2R$ ,  $OCOR$ ,  $SR$ ,  $SCH_2R$ ,  $SCOR$ , R étant tel que défini ci-dessous,

M représente un atome d'hydrogène, ou un atome choisi parmi Na, K, Li, Cs, Rb, Mg et Ca,

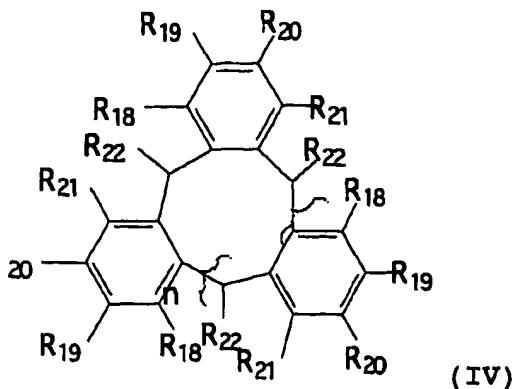
15 Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium ou acide carboxylique,

R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions 20 polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants  $R_{12}$  à  $R_{17}$ , M, Pol, et R peuvent être de nature différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (III) se présente sous forme d'une succession de 25 n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la 30 famille des cyclo[n]veratrylenes, répondant à la formule générale (IV)



dans laquelle

R<sub>18</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupement CH<sub>2</sub>, OH, OR, OCOR, COR, CH<sub>2</sub>Pol, OCH<sub>2</sub>R, SR, NR, Pol et R étant 5 ci-dessous définis,

R<sub>19</sub>, R<sub>20</sub>, R<sub>21</sub> et R<sub>22</sub>, chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupement CH<sub>2</sub>, OH, OR, OCOR, COR, CH<sub>2</sub>Pol, OCH<sub>2</sub>R, Pol et R étant ci-dessous définis,

Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, 10 ammonium ou acide carboxylique,

R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

15 n est un entier compris entre 1 et 10,

les substituants R<sub>18</sub> à R<sub>22</sub>, R, Pol et R peuvent être de nature différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (IV) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les 20 substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique (AML) pour la détection du prion PrP<sup>sc</sup> dans un échantillon biologique, 25 et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib), ci-dessus, libre ou lié à un support.

L'invention a également pour objet un kit de diagnostic des maladies dont la PrP<sup>sc</sup> est responsable, du type ESB, la tremblante des petits ruminants, Creutzfeld-Jakob, caractérisé en ce qu'il comprend l'utilisation du 5 ligand adjuvant macrocyclique et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) ci-dessus, libre ou lié à un support.

L'invention a également pour objet un kit de dosage immunologique de la PrP<sup>sc</sup> caractérisé en ce qu'il comprend 10 l'utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) ci-dessus, libre ou lié à un support.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent 15 concernant l'amplification de la détection de la PrP<sup>sc</sup> lorsque l'échantillon biologique est mis en présence d'un ligand adjuvant macrocyclique, libre ou greffé.

Il sera fait référence dans ces exemples aux dessins en annexe dans lesquels :

20 En référence à l'exemple 1 :

- la figure 1 est un exemple comparatif de la détection par immunoblotting de PrP<sup>sc</sup> d'une part dans un échantillon mis en présence d'un ligand adjuvant macrocyclique spécifique (AML1) dont la préparation est 25 décrite ci-après et, d'autre part, dans un échantillon non mis en présence d'AML1;

- la figure 2 représente les courbes de densité optique de détection de PrP<sup>sc</sup> d'une part dans un échantillon mis en présence d'AML1 et, d'autre part, dans un échantillon 30 non mis en présence d'AML1 ;

- la figure 3 montre des images en microscopie de sonde à balayage (SPM) en mode non-contact pour des films séchés de la protéine prion recombinante (recPrP) seule (A), de recPrP en présence d'AML1 (B) et d'AML1 seul (C) ;

- la figure 4 montre des images en microscopie de sonde à balayage (SPM) en mode non-contact pour des films séchés de recPrP en présence d'AML dans différentes proportions : 1/1000 AML1/recPrP, 1/100 AML1/recPrP, 1/10 5 AML1/recPrP.

- la figure 5 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) après incubation d'une solution de PrP 10 recombinante bovine et révélation par l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la peroxydase,

- la figure 6 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en calix-arène C6S greffé sur une bille amine activée (NHS) après incubation d'une solution de PrP 15 recombinante humaine dosée à 0,25 µg/ml par révélation directe avec l'anticorps anti-PrP 8D11G12 marqué à la peroxydase,

- la figure 7 est une représentation graphique donnant 20 les valeurs de densité optique (DO) obtenues après incubation avec une gamme de dilution de sérum humain dans du PBST 0,05% mise en contact avec du calix-arène C6S greffé sur une bille amine activée (NHS), par révélation directe avec l'anticorps anti-PrP 8D11G12 marqué à la peroxydase,

25 - la figure 8 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) avec des échantillons de liquide céphalo-rachidien humains positifs (LCR+) et négatifs (LCR-) pour la 30 MJC en fonction du chauffage, par révélation avec l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la phosphatase alcaline,

- la figure 9 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine

activée (NHS) avec de la PrP<sup>sc</sup> extraite de cerveaux de patients atteints ou non de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MJC+/MJC-), par révélation avec l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la phosphatase alcaline,

5 - la figure 10 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) après mise en contact avec un échantillon de LCR de patient non atteint de MJC, dilué au  
10 1/2 ou au 1/6, et en l'absence de digestion par la protéinase K,

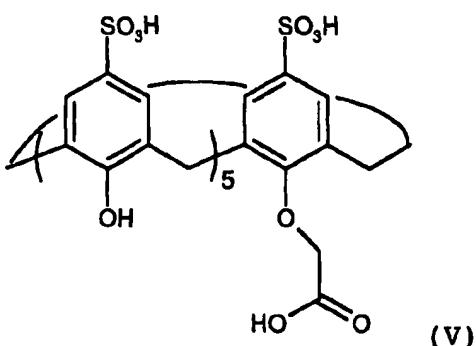
15 - la figure 11 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) après mise en contact avec un échantillon de LCR de patients non atteints de MJC (LCR-) ou atteints de cette maladie (LCR+), éventuellement dilué au 1/2 (LCR+1/2 ou LCR-1/2), en l'absence de digestion par la protéinase K, et

20 - la figure 12 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en protéinase K après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) avec un échantillon de LCR de patients non  
25 atteints de MJC (LCR-) ou atteints de cette maladie (LCR+),

Exemple 1 : Préparation des ligands adjuvants macrocycliques

30 1.1 Préparation du p-sulphonato-3,7-(2-carboxy-methyloxy)-calix-[6]-arène (dénommé AML 1)

Ce ligand adjuvant macrocyclique AML1 possède la formule générale (V) :

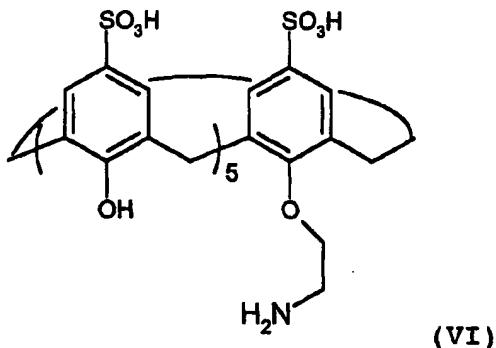


Ce ligand est synthétisé comme suit : une suspension de calix[6]arene dans l'acétonitrile en présence d'un équivalent de base ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) est agitée à reflux. Après 30 minutes, 0,5 équivalent d'agent alkylant (bromo-acétate d'éthyle) sont ajoutés dans le mélange réactionnel qui est maintenu à reflux et sous agitation pendant 24 heures. Après refroidissement de la suspension, le solvant est évaporé sous pression réduite et le solide résultant est dissous dans 200 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , et lavé deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) et une fois avec de l'eau déminéralisée. Après avoir été séché sur sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) le solvant organique est évaporé sous pression réduite et permet l'obtention d'une poudre blanche. Celle-ci est purifiée sur une colonne de chromatographie de silice (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :hexane; 4 :1). Le produit purifié est analysé en RMN du  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et en spectrométrie de masse electrospray. La saponification de l'ester carboxylique est réalisée par l'hydroxyde de potassium en solution dans un mélange eau : éthanol (30:70) sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le précipité formé est filtré puis lavé avec 50 mL d'acide chlorhydrique (1M) et 50 mL d'eau, puis purifié sur colonne de chromatographie de silice (éluant chloroforme : méthanol : acide acétique ; 95 :5 : 0.1%) et permet d'obtenir, après évaporation du solvant, un solide blanc et cristallin. Ce produit est analysé en RMN du  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et en spectrométrie de masse electrospray. La

sulfonation est réalisée par un traitement avec l'acide sulfurique à 50°C pendant 24 heures. Le produit est précipité avec de l'éther et permet d'obtenir l'AM11 sous forme d'une poudre blanche cristalline.

5        **1.2 Préparation du p-sulphonato-3,7-(2-amino-éthyloxy)-calix-[6]-arène (dénommé C6S)**

Ce ligand adjuvant macrocyclique C6S possède la formule générale (VI) :



10       Ce ligand est préparé selon la méthode décrite dans Eric Da Silva et Anthony W. Coleman, *Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene*, *Tetrahedron* 59 (2003) 7357-7364.

15

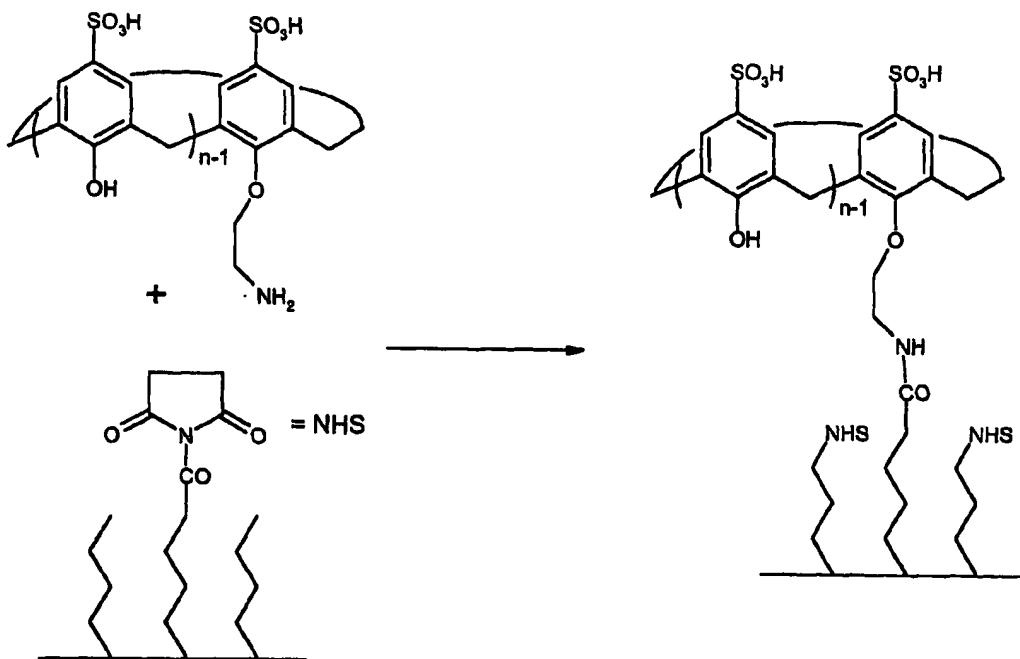
1.3 Greffage du Ligand C6S sur plaques et sur billes

Ce ligand est couplé avec un support solide (bille ou plaque) portant une surface activée.

Greffage sur plaque :

20       Les plaques « NHS activated plates » de 96 trous proviennent de la société Covalab (Lyon, France). 100µL d'une solution de ligand sont dissous à différentes concentrations dans du Tampon Phosphate 50mM pH 8,2. Les trous sont lavés 3 fois (3 x 200µL) à l'eau MilliQ après 25 deux heures d'incubation à 37°C. Les plaques sont séchées à température ambiante avant leur utilisation.

Schéma de greffage :



Plusieurs plaques ont été faites à différentes concentrations en ligand C6S. Ces plaques sont définies 5 comme « plaques C6S » dans tout le texte.

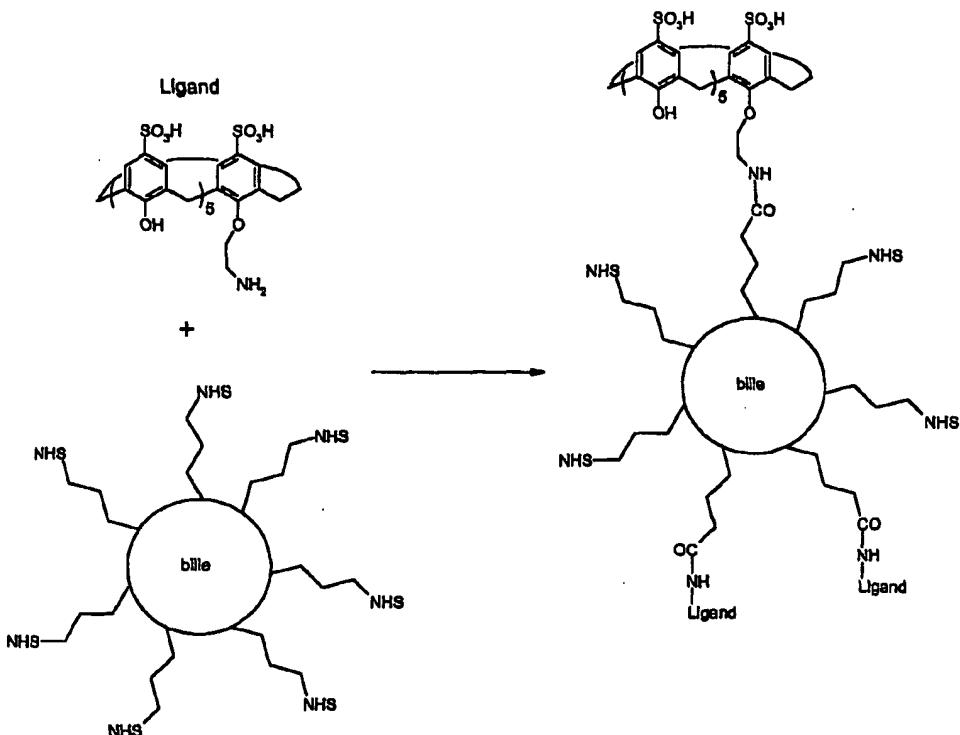
Greffage sur billes :

4 mL d'une solution de bille activée NHS ( $2 \times 10^9$  billes /mL ; Dynabeads® M270Amine, Société Dynals, Norvège) sont aliquotés en tubes de 1 mL. Les billes sont 10 centrifugées et précipitées par aimantation. Le surnageant est enlevé et les billes sont lavées 3 fois avec 1 mL d'eau. Le culot de bille est repris avec différents volumes de solution de calixarène dans un tampon phosphate 50mM pH 8,2. 15 600 $\mu$ L, 120  $\mu$ L, 60  $\mu$ L et 12  $\mu$ L d'une solution de ligand à 50 mg/mL (tampon phosphate 50mM, pH 8,2) sont ajoutés. Les billes sont agitées pendant 24 heures à température ambiante. Les billes sont lavées 3 fois avec de l'eau MilliQ 18Ω afin d'éliminer le ligand qui n'a pas réagi. Les billes sont conservées dans 1 mL d'eau afin de reconstituer la 20 concentration initiale de  $2 \times 10^9$  billes / mL. La solution

de bille est prête à l'emploi. Ces billes sont définies comme « billes C6S » dans tout le texte.

Schéma de greffage du C6S sur les billes :

5

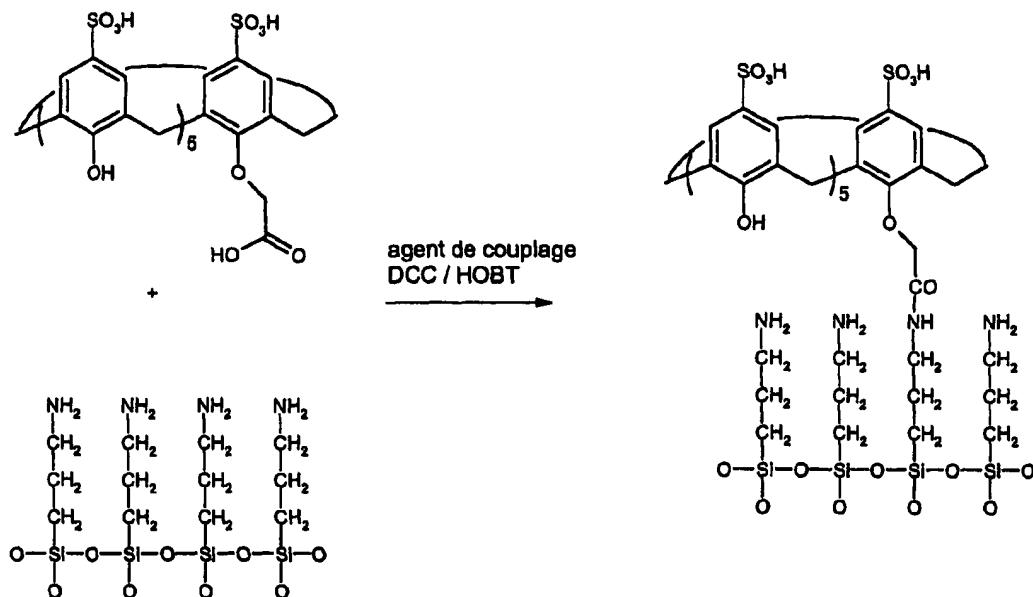


1.4 Greffage de AML1 sur une surface minérale modifiée

1 mL de 3-Aminopropyltri-methoxysilane (Société ABCR)

10 est mis en solution dans une solution de 50mL (95% Ethanol et 5% H<sub>2</sub>O) pendant 5 min. la plaque de silicium est plongée dans cette solution pendant 4 min sous agitation. On rince la plaque de silicium avec de l'éthanol puis la plaque est mise à sécher à 130°C pendant 15 min. 10µL de AML1 en 15 solution 0,1M dans le DMSO ont été couplés sur une plaque de silicium modifiée en utilisant un agent de couplage (DCC/HOBt). L'échantillon a été séché pendant 12 heures à 23°C.

## Schéma de couplage :



**Exemple 2 : Détection de PrP en utilisant l'AML1 non  
5 couplé à un support solide**

**2.1 Préparation des échantillons**

Les échantillons qui ont servi à la réalisation des exemples des figures 1 et 2 ont été préparés comme suit :

Echantillon sans AML : 0,5g de tissu de cerveau est 10 broyé dans 4,5 mL de solution glucose 5 % pour obtenir une suspension à 10 % en poids/volume. Pour 100  $\mu$ l d'homogénat de cerveau à 10 % dans du glucose à 5 % (équivalent à 10 mg de cerveau) est ajoutée 1  $\mu$ g de protéinase K (Boehringer) dans 10  $\mu$ l. La solution est mise sous vortex et incubée à 37°C 15 pendant une autre heure. Après avoir ajouté 100  $\mu$ l de tampon Laemmli dénaturant, on chauffe 5 minutes à 100 °C, on centrifuge à 12000 G pendant 5 mn, et on récupère les surnageants pour les faire migrer sur SDS PAGE.

Echantillon avec AML : 0,5g de tissu de cerveau est 20 broyé dans 4,5 mL de solution glucose 5 % pour obtenir une suspension à 10 % en poids/volume. Pour 100  $\mu$ l d'homogénat de cerveau à 10 % dans du glucose à 5 % (équivalent à 10 mg de

cerveau), on ajoute 1  $\mu$ l d'AML 0,1M. Après une heure à 37°C, 1,5  $\mu$ g de protéinase K (Boehringer) dans 10  $\mu$ l est ajoutée. La solution est mise sous vortex et incubée à 37°C pendant une autre heure. Après avoir ajouté 100  $\mu$ l de tampon Laemmli 5 dénaturant, on chauffe 5 minutes à 100 °C, on centrifuge à 12000 G pendant 5 mn, et on récupère les surnageants pour les faire migrer sur SDS PAGE.

#### 2.2 Procédé de détection par immunoblotting

Après migration sur un gel d'électrophorèse 10 unidimensionnelle de 15% de polyacrylamide en présence de sodium dodécy1 sulfate (SDS PAGE) comme décrit par Laemmli, Nature 227 (1970), 680-685, les protéines sont transférées par électrophorèse sur des membranes nitrocellulose et immunoblotées à température ambiante pendant 60 minutes 15 avec un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope spécifique constitué des acides aminés 126-160. L'anticorps secondaire (1/5000) est un anticorps de chèvre dirigé contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines de souris conjuguées à la peroxydase de raifort (IgG H+L).

20 Les blots sont ensuite lavés et les signaux sont détectés par chimioluminescence soit avec un kit ECL (Amersham) sur des films (Biomex light, Kodak) ou avec un super Signal Ultra (Pierce) et visualisation sur Fluor S. Multimager (BioRad).

25 La figure 1 est un exemple comparatif qui montre que la détection du prion est amplifiée au moins quatre fois lorsque le procédé de l'invention est mis en œuvre, par rapport à la détection de la même protéine en absence d'AML1. En absence d'AML1, pour des dilutions supérieures au 30 1/8<sup>e</sup>, aucune PrP<sup>sc</sup> n'est détectée. En présence d'AML, la détection de la PrP<sup>sc</sup> dans le même échantillon est possible jusqu'à une dilution au 1/32<sup>e</sup>. Les résultats de la figure 2 montrent la détection.

### 2.3 Résultats de microscopie

Les échantillons qui ont servi pour les expériences en microscopie de sonde à balayage reportées dans les figures 3 5 et 4 ont été préparés comme suit :

Echantillons contenant du ligand adjuvant macrocyclique uniquement : des échantillons contenant du ligand adjuvant macrocyclique (50 mM) sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement clivé de 10 µl de solution 10 d'AML respectivement et de 10 µl d'eau et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

Echantillons contenant de la protéine PrP recombinante (recPrP) uniquement : des échantillons contenant du recPrP (50 mM) sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement 15 coupé de 10 µl de solution de 1/10 (v/v) AML1/recPrP, 1/100 (v/v) AML1/recPrP et 1/1000 (v/v) AML1/recPrP respectivement et de 10 µl d'eau et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

Echantillons comprenant à la fois du ligand adjuvant 20 macrocyclique et du recPrP : 1) des échantillons contenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement clivé de 1 µl de solution d'AML et de 1000 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C ; 2) des échantillons 25 contenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique (AML1) et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement coupé de 1 µl de solution d'AML et de 100 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C ; 3) des échantillons contenant à la fois du ligand adjuvant 30 macrocyclique et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement coupé de 1 µl de solution d'AML et de 10 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

On effectue une analyse par imagerie au moyen d'un Thermomicroscope Explorer AFM équipé avec un scanner trépied 100µm, en mode non-contact, utilisant des fréquences de résonance élevées ( $F_0 = 320$  kHz) de cantilever pyramidal avec des sondes silicones à une fréquence de balayage de 1 Hz. Le traitement des images est réalisé avec le logiciel SPMlab 5.1 et présentées non-filtrées.

Il ressort des figures 3 et 4 que les films de recPrP seuls montrent une structure en agrégats circulaires caractéristique. En présence d'AML, les structures observées pour le recPrP sont modifiées séquentiellement, sont fonction croissante de la quantité d'AML et montrent des motifs arrondis et éventuellement cristallite orthogonal. Les images du ligand adjuvant macrocyclique seul (AML1) montrent des structures ressemblantes, mais en plus petites, aux motifs des films recPrP- AML.

D'autres expériences ont été réalisées par microscopie à force atomique.

Une analyse ultérieure par analyse de surface de la rugosité est donnée dans le tableau I. L'utilisation de ces mesures de rugosité peut être étendue à des techniques d'analyses profilométriques.

TABLEAU 1

25

	AML seul	AML/ recPrP 1/1000	AML/ recPrP 1/100	AML/ recPrP 1/10	recPrP seul
Ra (nm)	48	69,6	123,9	134,4	1,11
RMS (nm)	58,7	82,8	149	163,1	1,95
Hauteur moyenne	217,7	233,3	408,7	469,8	5,4
Valeur maximale de hauteur	448,9	484,3	894,66	1056,9	43,17

5

(Formule A)

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \bar{z}|$$

(Formule B)

10

$$Avg\ Height = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i$$

(Formule C)

Les valeurs de rugosité calculées sont obtenues par le logiciel du Thermomicroscope SPML 5.01. La rugosité moyenne 15 Ra est définie comme la moyenne arithmétique des déviations de hauteur (formule A), la racine moyenne de la rugosité carrée (root mean square roughness RMS) est définie comme la racine carrée de la valeur moyenne des carrés des distances des points à la valeur moyenne d'image (formule B) et la 20 hauteur moyenne de l'échantillon (formule C).

Exemple 3 : Détection de PrP recombinante en utilisant le C6S greffé à un support solide

3.1 Détection de PrP recombinante bovine sur plaques

25 a) protocole

Le protocole employé dans cette expérience est calqué sur celui réalisé dans un ELISA classique.

Selon l'exemple 1, le greffage des plaques amine activées (NHS) est réalisé durant 6 heures avec une gamme de 30 Calix-6-Arènes Sulfonés (C6S) dilué dans une solution de PBS

50 mM (phosphate buffer saline). Les plaques sont ensuite rincées à l'eau distillée avant d'être saturées par une solution de PBST (PBS Tween) (0,05% lait 5% pendant 1 heure à température ambiante. Après rinçage, est déposée une 5 solution de protéine prion (PrP) recombinante bovine diluée à une concentration de 0,25 µg/ml dans du PBST 0,05%. Elle est incubée une heure à température ambiante. La plaque est de nouveau rincée trois fois. Puis elle est incubée avec une 10 solution d'anticorps anti-PrP marqués à la peroxydase diluée à 0,5 µg/ml dans du PBST 0,05% durant une heure à température ambiante. L'anticorps utilisé reconnaît la 15 région définie par les acides aminés 145-154 de la PrP humaine et les régions homologues des PrP animales (AC23). Enfin, après un nouveau cycle de rinçage, est ajouté le révélateur, une solution d'OPD (ortho-phénylènediamine) qui est incubée 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide 20 d'un spectrophotomètre à 495 nm.

20           b) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 5 qui montre que la densité optique (DO) mesurée en ordonnée reflète la quantité de PrP capturée par les C6S et restée accrochée après lavages. Le signal obtenu pour les différents 25 greffages montre que la PrP recombinante bovine est bien capturée par les C6S. La PrP recombinante bovine se fixe sur les C6S greffés sur les plaques NHS.

3.2 Détection de la PrP recombinante humaine sur billes

30           a) Conditions expérimentales :

Selon l'exemple 1, les billes NHS sont tout d'abord mises en contact avec une solution de C6S diluée dans de l'eau distillée pour greffage du C6S sur les billes. Après cette période, les billes sont lavées à l'eau distillée puis

au PBST 0,05%. Une solution de PrP recombinante humaine dosée à 0,25 µg/ml dans du PBST 0,05% est préparée parallèlement. Puis on réalise une gamme de billes C6S par ajout de respectivement : 0 ; 0,1 ; 1 ; 5 et 10µl de la 5 solution de billes pour 100µl de la solution de PrP. L'incubation dure 1 heure à 37°C, puis les billes sont séparées du surnageant par aimantation. La PrP fixée sur les billes est dosée directement à l'aide d'un anticorps marqué selon une méthode sandwich proche de la méthode ELISA.

10 L'anticorps de révélation marqué à la peroxydase est incubé une heure à 37°C après rinçages des billes par une solution de PBST 0,05%. Les billes sont séparées du surnageant par aimantation avant d'être de nouveau lavées puis révélées par une solution d'OPD incubée 10 minutes. La 15 réaction est stoppée à l'aide d'une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'anticorps de révélation employé est le 8D11G12 (bioMérieux, France).

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 495 nm.

20 b) Résultats

Les résultats de révélations sur bille sont indiqués sur la figure 6 et montrent que les C6S sont correctement greffées sans perte de fonction sur les supports NHS mais surtout gardent leur propriété de capture de la PrP recombinante de différentes espèces et amplifient même le 25 signal obtenu avec les anticorps spécifiques de cette protéine de façon reproductible.

Exemple 4 : Détection de PrP physiologique en 30 utilisant le C6S greffé à un support solide

4.1 Sérum humain sur billes

a) Protocole :

Selon l'exemple 1, les billes NHS sont tout d'abord mises en contact avec une solution de C6S diluée dans de

l'eau distillée pour le greffage. Après cette période, les billes sont lavées à l'eau distillée puis au PBST 0,05%.

Une gamme de sérum est préparé par dilution dans du PBS. Une solution de PrP recombinante humaine dosée à 0,25 5  $\mu$ g/ml dans du PBS est préparée parallèlement ainsi qu'une solution de PBST 0,05% lait 5% qui serviront respectivement de témoin positif et négatif.

Les billes sont ajoutées à raison de 5  $\mu$ l d'une solution de  $2 \cdot 10^9$  billes/ml pour 250  $\mu$ l d'échantillon. 10 L'incubation dure 1 heure à 37°C sous agitation. Les billes sont ensuite séparées du surnageant par aimantation. La PrP fixée sur les billes est dosée directement à l'aide d'un anticorps marqué.

La révélation sur billes utilise un protocole proche 15 de l'ELISA. L'anticorps de révélation marqué à la peroxydase est incubé une heure à 37°C et sous agitation douce après rinçage des billes par une solution de PBST 0,05%. Les billes sont séparées du surnageant par aimantation avant 20 d'être de nouveau lavées puis révélées par une solution d'OPD incubée 10 minutes. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution d' $H_2SO_4$ . L'anticorps de révélation employé est le 8D11G12.

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide 25 d'un spectrophotomètre à 495 nm.

#### 25 b) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 7 qui met en évidence que :.

- le témoin négatif dans le lait permet d'évaluer le bruit de fond tandis que le témoin positif dans une solution 30 de PrP 0.25 $\mu$ g/ml permet de vérifier que l'expérience a fonctionné et est interprétable.

- les C6S greffées sur les billes NHS capturent la PrP physiologique présente dans le sérum humain. De plus, la capture est meilleure lorsque la dilution du sérum est

augmentée avec un plateau de saturation atteint pour les dilutions au 1/5<sup>ème</sup> et au 1/10<sup>ème</sup>.

c) Conclusion

De façon surprenante, les C6S greffées sur billes NHS 5 capturent la PrP physiologique présente dans le sérum humain. Les dilutions du sérum permettent d'augmenter le signal obtenu sur les billes.

4.2 Liquide Céphalorachidien (LCR) humain sur plaques

a) Conditions expérimentales :

10 Les échantillons de LCR sont tout d'abord répartis en tubes de volume équivalents. Deux points de dilution : pur et au 1/2 sont réalisés pour chaque échantillon. Puis ceux-ci sont soumis à trois types de traitement par la chaleur : 30 minutes à 56°C, 15 minutes à 75°C ou 5 minutes à 95°C. Un 15 témoin sans chauffage est réalisé en parallèle pour les échantillons purs.

Selon l'exemple 1, parallèlement, les plaques NHS sont mises en contact durant 6 heures avec une solution de C6S diluée dans une solution de PBS 50 mM pour le greffage.

20 Les plaques sont ensuite rincées à l'eau distillée puis au PBST 0,05%.

Les échantillons sont alors déposés et incubés une nuit à 2-8°C. La plaque est ensuite rincée six fois. Puis elle est incubée avec une solution d'anticorps anti-PrP 25 marqués à la biotine diluée à 0,5 µg/ml dans du PBST 0,05% durant une heure à température ambiante. L'anticorps utilisé est le AC23.

Après un nouveau cycle de rinçage, est ajoutée une solution de Streptavidine-PAL (Phosphatase Alcaline) qui est 30 incubée 20 minutes à température ambiante. La plaque est une dernière fois rincée et la solution de révélation de PNPP est déposée et incubée 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution de NaOH 0,4N.

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm contre un filtre à 490 nm.

b) Résultats :

Les résultats sont indiqués sur la figure 8 qui met en 5 évidence que la PrP physiologique peut être dosée dans le LCR.

Exemple 5 : Détection de PrP<sup>sc</sup> dans le cerveau en utilisant le C6S greffé à un support solide

10 5.1 Détection sur plaque

a) Conditions expérimentales :

La première étape consiste à obtenir de la PrP<sup>sc</sup> purifiée par extraction à partir de cerveaux de patients atteints ou non de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MJC). Un 15 échantillon de 260 mg de chaque cerveau est prélevé puis broyé afin d'obtenir un homogénat 10% en glucose 5%. Le broyat est ensuite filtré à l'aide d'une aiguille. Puis vient une étape de digestion par la protéinase K. Elle est utilisée à la concentration de 20 µg pour 100 mg de tissu à 20 37°C pendant 1 heure. Ensuite, 650 µl d'une solution de Sarkosyl 30% sont ajoutés. En parallèle, un coussin de saccharose de 400 µl est déposé au fond d'un tube pour ultracentrifugation. L'échantillon est ensuite déposé sur ce coussin. Les tubes sont complétés avant d'être soudés puis 25 ultracentrifugés 2 heures à 20°C à 100 000 rpm. Les surnageants sont éliminés et les parois des tubes sont grossièrement séchées avec du papier absorbant. Les culots sont ensuite repris dans du Tris-Maléate. Les échantillons sont alors chauffés 5 minutes à 95°C puis centrifugés 15 30 minutes à 12 000 rpm à 20°C. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur prochaine utilisation. La réussite de cette première étape a été confirmée par Western Blot.

b) Test sur plaques Calix-6-Sulphonates

Selon l'exemple 1, le greffage des plaques NHS est réalisé durant 6 heures avec une gamme de C6S dilué dans une solution de PBS 50 mM. Elles sont tout d'abord saturées par une solution de PBST 0,05% lait 5% durant 6 heures à 5 température ambiante. Puis elles sont lavées trois fois par une solution de PBST 0,05%. L'échantillon préalablement dilué en tris maléate est déposé sur la plaque et incubé une nuit à 2-8°C. La plaque est ensuite lavée 6 fois en PBST 0,05%. La solution d'anticorps de révélation est incubée 10 une heure à température ambiante. Après une nouvelle série de lavage est incubée la streptavidine-PAL durant 20 minutes. La plaque est lavée une dernière fois avant le dépôt de PNPP (para-nitrophénylphosphate) qui est incubé 30 minutes à 15 37°C. Puis la réaction de révélation est stoppée par ajout de soude.

La lecture de la DO est effectuée à 405 nm contre un filtre à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

c) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 9 qui montre 20 que, de façon surprenante, la PrP<sup>sc</sup> des échantillons issus de patients atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob est détectable par le procédé de l'invention utilisant une capture par des C6S greffées sur plaques NHS et une détection par un anticorps dirigé spécifiquement contre la 25 protéine PrP, ceci étant validé par les témoins positifs PrP recombinante humaine et négatifs PBST 0,05%.

Exemple 6 : Détection de PrP<sup>sc</sup> dans le LCR en utilisant le C6S greffé à un support solide

30 6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont constitués de prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR) de préférence non hémolysés et sans débris cellulaires. Ces prélèvements sont anonymes et sont conservés congelés à -(80°C) dans des tubes à parois

faiblement adsorptives pour les protéines (« Pre-lubricated micro centrifuge tube 1,7 mL », Marsh Biomedical Products, réf. T6050G).

Ils se répartissent en deux catégories :

5 D'une part, les échantillons positifs pour la MJC.

Ce sont des LCR post-mortem, récupérés lors de l'autopsie par ponction dans les citerne, et dont la recherche de la PrP<sup>sc</sup> dans le tissu cérébral par western blot a permis de confirmer le diagnostic de la MJC (cas 10 certains). Lors de l'autopsie, le LCR prélevé est immédiatement réparti dans les tubes décrits précédemment, sans centrifugation au préalable (à l'exception des échantillons présentant des débris cellulaires en quantité importante), et les aliquotes sont congelés à -80°C.

15 D'autre part, les échantillons négatifs pour la MCJ.

Ils sont de 2 types :

LCR post-mortem récupérés lors de l'autopsie et dont la recherche de la PrP<sup>sc</sup> dans le tissu cérébral par western blot a permis d'éliminer le diagnostic de la MJC (témoins 20 négatifs pour la MJC)

LCR de patients non atteints de MJJ et issus de dérivations ventriculaires externes (DVE). Les conditions de stockage de ces prélèvements sont identiques à celles décrites précédemment.

25 **6.2 Approche ELISA**

a) principe analytique

Les échantillons sont simplement incubés à température élevée pendant un temps donné puis, après refroidissement, ils sont dilués au 1/2 ou au 1/5 dans un tampon compatible 30 avec une analyse immunométrique (ELISA) (tampon Tris-Maléate pH 8). Lorsque la digestion par la protéinase K intervient avant le dépôt sur plaque C6S, les échantillons sont digérés par la protéinase K pendant 15 minutes puis sont déposés ainsi sur plaque C6S sans inhibition au préalable.

Le terme ELISA est employé bien que la capture ne soit pas immunologique car il s'agit d'une réaction de type ligand/affinant avec révélation immunologique.

Les techniques ELISA sont des techniques immuno-enzymologiques quantitatives, permettant de doser l'antigène recherché par la transformation d'un substrat en un produit soluble mesurable et proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. La technique utilisée ici comporte les mêmes étapes qu'un ELISA sandwich non compétitif classique à l'exception de la sensibilisation des cupules. En effet, l'anticorps anti-prion de capture est remplacé par les Calix-6-Arènes sulfonés, greffés sur les groupements NHS des microplaques par leur fonction amine.

Après immobilisation des C6S au fond des cupules d'une microplaque et saturation des sites non spécifiques de fixation de l'antigène, l'échantillon est déposé et la plaque est incubée pour permettre la liaison de l'antigène avec le C6S. Puis, après plusieurs lavages, l'anticorps de révélation, spécifique de la protéine prion et marqué, est ajouté. Les complexes formés sont visualisés par méthode colorimétrique, après ajout du substrat de l'enzyme, qui se transforme en produit coloré, dont l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (spectrophotomètre automatisé).

25           b) Mode opératoire

Un volume de LCR est incubé au bain-marie sec à 75°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'échantillon est dilué 5 fois dans du tampon Tris-Maléate 0,2 M, pH 8 (ajout de 4 volumes de tampon) et est, soit déposé directement sur une microplaque sensibilisée au préalable par les C6S, soit digéré par la protéinase K pendant 15 minutes à 37°C, puis déposé sur microplaque.

Les étapes successives de l'analyse immunométrique sont énumérées ci-dessous dans l'ordre chronologique :

1 - Le greffage des Calix-6-arènes sulfonés C6S sur les plaques amine activées (NHS) est réalisé suivant la méthode mentionnée ci-dessus durant 6 heures à température ambiante selon une gamme de concentration ou selon une 5 concentration fixe, dilués dans une solution de PBS 50 mM.

2 - Les plaques sont ensuite lavées 3 fois en PBST 0,05% puis saturées en PBST 0,05%-Lait 5% pendant 1 heure à 37°C.

3 - Après lavage, 100 µL de LCR préparé selon le 10 principe analytique décrit ci-dessus sont déposés par puits ; les plaques sont incubées pendant 1h30 à 37°C.

4 - Après lavage, 100 µL de l'anticorps de révélation sont déposés par puits (AC23-HRP, HPR pour peroxydase de raifort, à 0,5 µg/mL ou AC23-Biotine à 0,5 µg/mL). Les 15 plaques sont incubées pendant 1 heure à température ambiante.

5 - Après lavage, les complexes formés sont révélés :

5.1 - Si l'anticorps de révélation est couplé à la biotine, 100 µL d'une solution de SA-PAL diluée au 1/20000 20 en tampon PBST 0,05% sont déposés par puits. Les plaques sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Après lavage, 100 µL de PNPP sont déposés par puits. Les plaques sont incubées pendant 10 à 30 minutes à 37°C. A l'issue de l'incubation, la réaction colorimétrique est 25 stoppée par l'ajout dans chaque puits de 50 µL de NaOH à 0,4 N. La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 405 nm contre un filtre à 450 nm.

5.2 - Si l'anticorps de révélation est couplé à la peroxydase, 100 µL d'OPD sont déposés par puits. Les plaques 30 sont incubées pendant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

A l'issue de l'incubation, la réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout dans chaque puits de 50 µL d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à

1,8 N. La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 495 nm.

b) Résultats

1 - Vérification de l'association des Calix-6-Arènes sulfonés mono-amines (C6S) greffés sur microplaqué avec la protéine prion du liquide céphalo-rachidien (LCR) :

Un liquide céphalo-rachidien de patient non atteint de la maladie de Creutzfeld-Jakob est chauffé pendant 15 minutes à 75°C et est ensuite dilué au 1/2 ou au 1/6 dans un tampon compatible avec une révélation immunologique en ELISA. Les échantillons ne sont pas digérés par la protéinase K et sont déposés ainsi sur une plaque greffée avec des C6S selon une gamme de concentration comprise entre 1,8 et 18 µg/mL. Après incubation, la révélation immunologique de l'antigène capturé sur les C6S est assurée par l'anticorps AC23 couplé à la peroxydase, utilisé à 0,5 µg/mL. Les résultats sont présentés sur la figure 10.

Ces résultats montrent que les C6S s'associent bien avec une forme de protéine prion dans le LCR puisqu'un signal est observé dès la première concentration de C6S immobilisés au fond des cupules.

2 - Vérification de l'association des C6S avec la protéine prion pathologique en phase hétérogène sans utilisation de protéinase K:

Un LCR de patient non atteint de MJJ (LCR-) et un LCR de patient décédé de MJC (MJC+) non dilués ou dilués au 1/2 subissent différents types de traitement par la chaleur. Ils sont ensuite déposés sur plaque greffée avec les C6S à 7,2 µg/mL. Après lavage, la révélation immunologique est assurée par l'anticorps anti-prion AC23 couplé à la biotine.

Les résultats sont représentés graphiquement en figure 11.

Ces résultats montrent une adsorption de la protéine prion sur les C6S greffés sur la plaque en absence de

traitement par la protéinase K plus efficace pour l'échantillon positif que pour l'échantillon négatif. Les différents traitements par la chaleur influencent légèrement l'efficacité d'adsorption de la protéine prion sur les C6S 5 en absence de dilution et davantage lorsque l'échantillon est dilué. Ainsi, les conditions expérimentales favorisant l'adsorption de la protéine prion sur les C6S MN en phase hétérogène semblent être une dilution des échantillons et un traitement pendant 5 minutes à 95°C.

10 3 - Vérification de l'association des C6S avec la protéine prion pathologique en phase hétérogène avec utilisation de protéinase K:

15 On a utilisé une étape de digestion par la protéinase K pendant 15 minutes à 37°C en traitement pré-analytique, avant capture sur plaque C6S du mélange digestionnel pendant 1 heure à 37°C. L'élimination de la protéinase K résiduelle est assurée par des lavages successifs en tampon PBS-Tween 0,05%.

20 Les résultats sont indiqués sur la figure 12.

Ces résultats montrent une différence de densité optique en faveur de l'échantillon positif pour la MJC après digestion par la protéinase K. Ce différentiel est visible dès la première concentration de protéinase K testée (0,5 µg/mL).

25 d) Conclusion

La détection de la protéine prion dans le LCR est rendue possible selon le procédé de l'invention. En effet, en absence de digestion par la protéinase K, la détection de la PrP totale (cellulaire et pathologique) est amplifiée en 30 présence des Calix-6-Arènes sulfonés et, de façon inattendue, la PrP<sup>sc</sup> est préférentiellement détectée. L'utilisation de ces C6S en capture, après digestion des échantillons par la protéinase K, permet de détecter la PrP<sup>sc</sup> du LCR en fournissant un signal significativement

différent entre les LCR issus de patients non atteints de MJC et les LCR issus de patients atteints de MJC.

## REVENDICATIONS

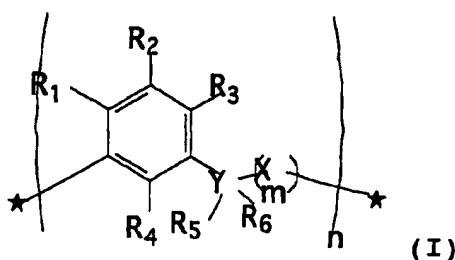
1. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup>, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP<sup>sc</sup>, un ligand adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP<sup>sc</sup>, et on détecte la présence de PrP.
- 10 2. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire de traitement de l'échantillon avec de la protéinase K avant ou après contact avec l'AML.
- 15 3. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique provient d'un animal, y compris l'homme.
- 20 4. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit échantillon est un tissu ou un fluide biologique, notamment le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.
- 25 5. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit support solide est de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH<sub>2</sub>, et est de préférence une bille magnétique ou une microplaquette.
- 30 6. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit ligand adjuvant macrocyclique se

lie à des sites contigus ou proches dans l'espace des sites de liaison de la PrP<sup>sc</sup> avec un anticorps.

7. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des métacyclophanes et en particulier parmi les calix-arènes.

10 8. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon la revendication 7, caractérisé en ce que les calix-arènes préférés sont les *para*-sulfoanto-calix-arènes fonctionnalisés sur la face phénolique, de préférence le *p*-sulphonato-calix-[4]-arène, le *p*-sulphonato-calix-[6]-arène, le *p*-sulphonato-calix-[8]-arène, ou l'un de leurs dérivés.

9. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une quelconque des revendications 7 ou 20 8, caractérisé en ce que le ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessous



dans laquelle

25 R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

R<sub>2</sub> représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol, CH<sub>2</sub>Pol, dans lesquels Pol représente un groupe

phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

R<sub>4</sub> représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe OCH<sub>2</sub>R ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub>, chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH<sub>2</sub>, ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement CH<sub>2</sub>, ou un atome d'oxygène ou de soufre,

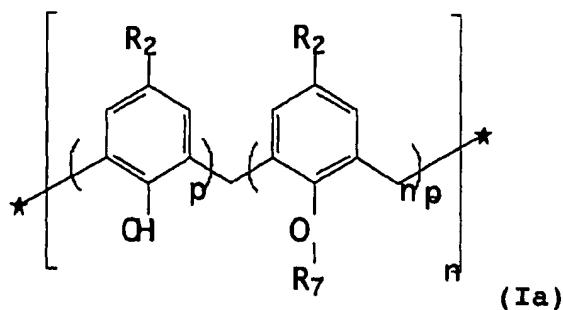
m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R<sub>1</sub> à R<sub>5</sub>, R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

10. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (Ia) ci-dessous



dans laquelle

chaque groupement  $R_2$ , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate ,

5  $R_1$  est un groupement  $(CH_2)_r-Z$  dans lequel  $Z$  est un groupement  $COOEt$ ,  $COOH$ ,  $CN$  ou  $NH_2$ ,

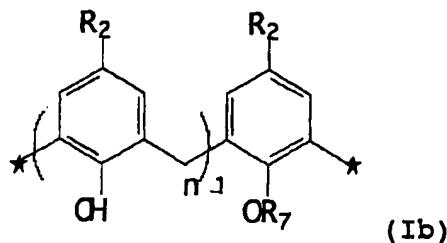
$r$  est un entier compris entre 1 et 20,

$p$  est un entier compris entre 1 et 10,

$n$  est un entier compris entre 2 et 10.

10

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand répond à la formule (Ib) ci-dessous :



dans laquelle

15  $n$  est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement  $R_2$ , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate ,

$R_8$  représente un groupement  $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$  ou un groupement  $(CH_2)_t-COOH$  où  $t$  est un entier compris entre 0 et

20  $s$  est un entier compris entre 0 et 6.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit ligand est un calix-arène de formule (Ib) dans lequel les deux groupements  $R_2$  sont chacun un

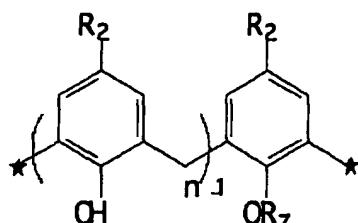
groupement sulfate,  $n$  est 4, 6 ou 8, et  $R_8$  est un atome d'hydrogène, un groupement  $CH_2COOH$ , un groupement  $CH_2CONH_2$  ou un groupement  $CH_2CH_2NH_2$ .

5        13. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit ligand est tel que les deux groupements  $R_2$  sont chacun un groupement sulfate,  $n$  est un entier égal à 6, et  $R_8$  est un groupement  $(CH_2)_2-NH_2$ .

10        14. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP<sup>sc</sup> selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que ledit calixarène est lié à un support fonctionnalisé notamment au moyen d'une fonction NHS ou  $NH_2$ .

15        15. Ligand adjuvant macrocyclique greffé sur un support fonctionnalisé, dans lequel le ligand répond à la formule (Ib)

20



(Ib)

25        dans laquelle dans laquelle  $n$  est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement  $R_2$ , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

30         $R_8$  représente un groupement  $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$  ou un groupement  $(CH_2)_t-COOH$  où  $t$  est un entier compris entre 0 et 6 et  $s$  est un entier compris entre 0 et 6,

et le support est du type support solide de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH<sub>2</sub>, et est de préférence une bille magnétique ou une microplaqué.

5

16. Utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique pour la fabrication d'une composition destinée à la détection de la PrP, de la PrP recombinante, physiologique ou pathologique, bovine ou humaine ou d'autres espèces, 10 PrP<sup>sc</sup> dans un échantillon biologique, notamment un fluide biologique, et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

15 17. Kit de diagnostic des maladies dont le PrP<sup>sc</sup> est responsable, du type ESB, la tremblante de petits ruminants, Creutzfeld-Jakob, caractérisé en ce qu'il comprend un ligand adjuvant macrocyclique, et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les 20 revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

18. Kit de dosage immunologique de la PrP<sup>sc</sup> caractérisé en ce qu'il comprend un ligand adjuvant macrocyclique, et en particulier d'un ligand de formule (I), 25 (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

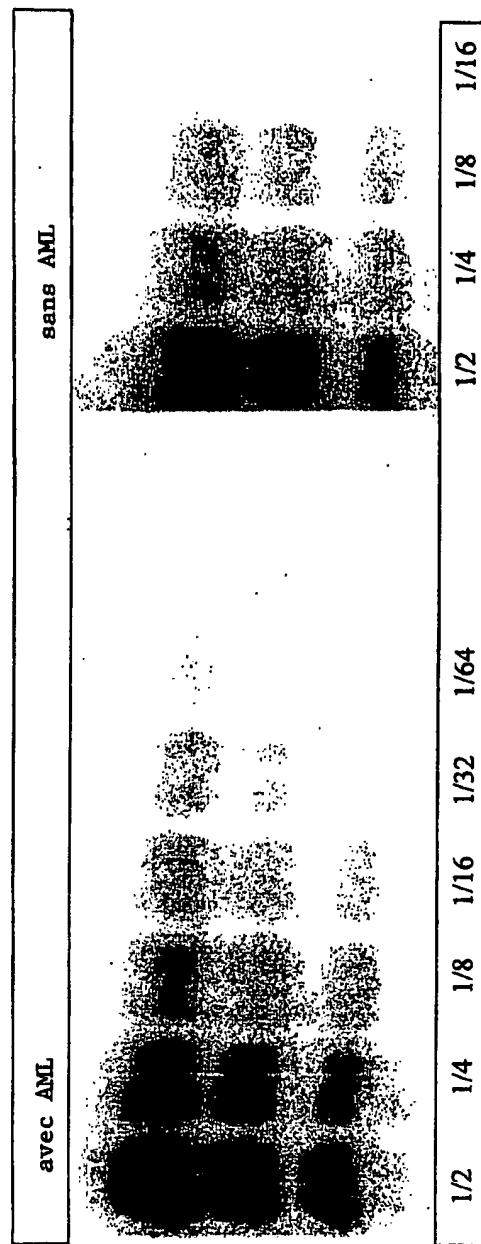


Figure 1

Dilution	Avec AML				Sans AML		
	1/8	1/16	1/32	1/64	1 / 4	1/8	
Ligne	1	2	3	4	5	6	7
4257	1883	1331	538		3074	1081	
3162	1190	761			2067	787	
1503	426	355			1184	501	

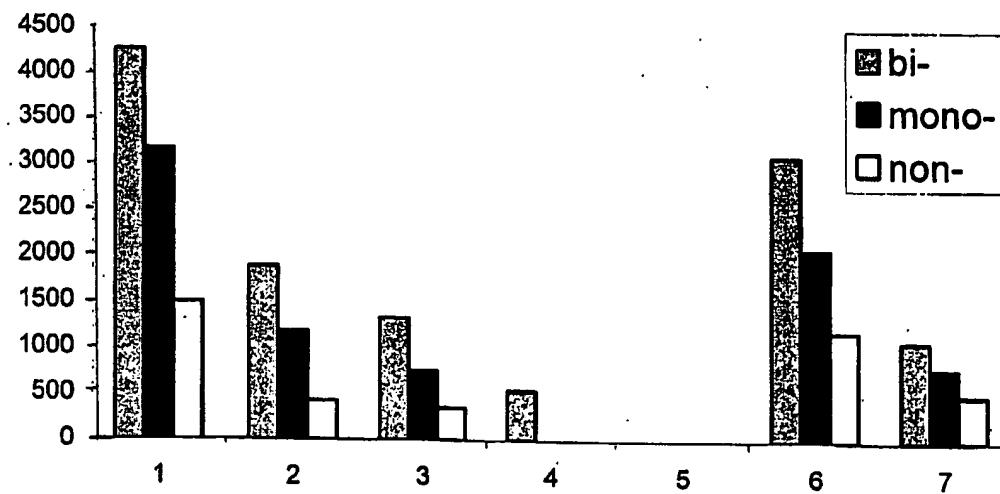


Figure 2

3/11

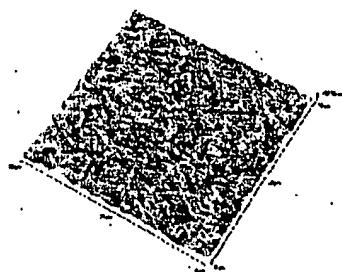


Figure 3 A

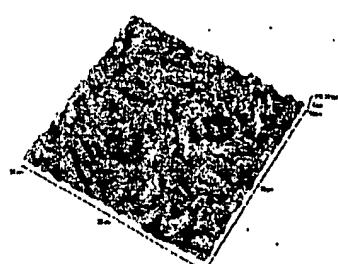


Figure 3 B

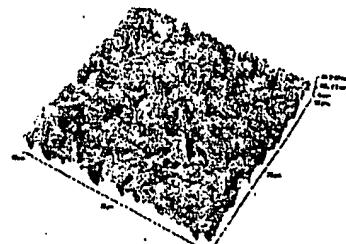


Figure 3 C

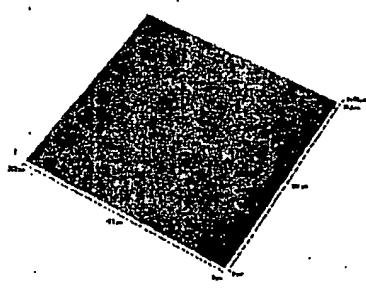


Figure 4 A

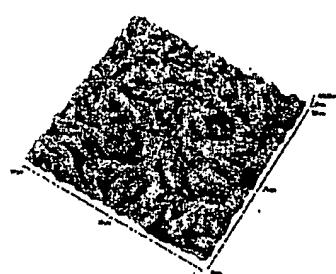


Figure 4 B

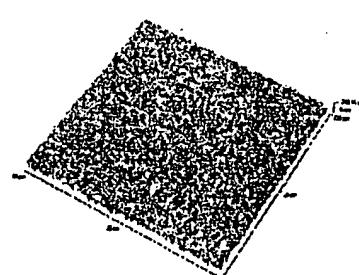
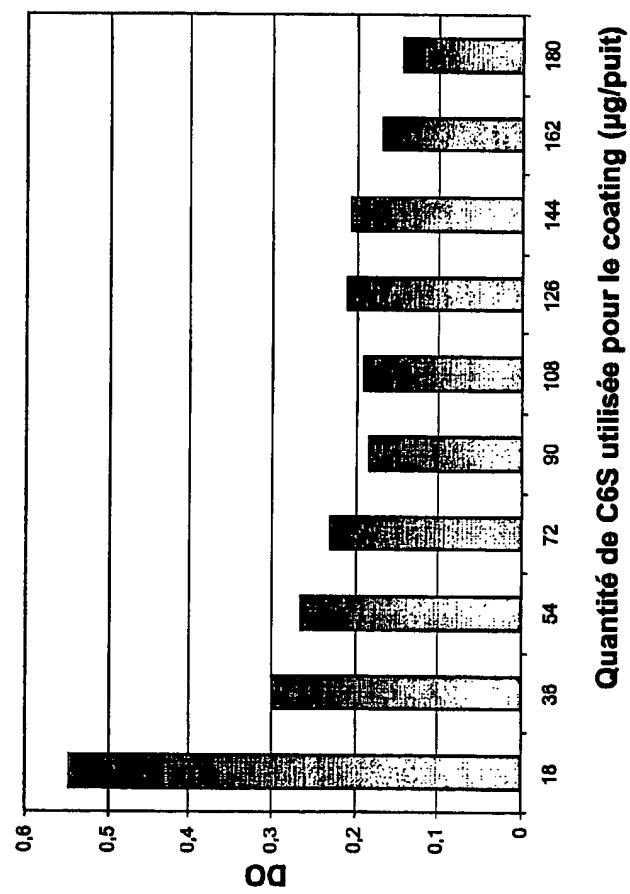


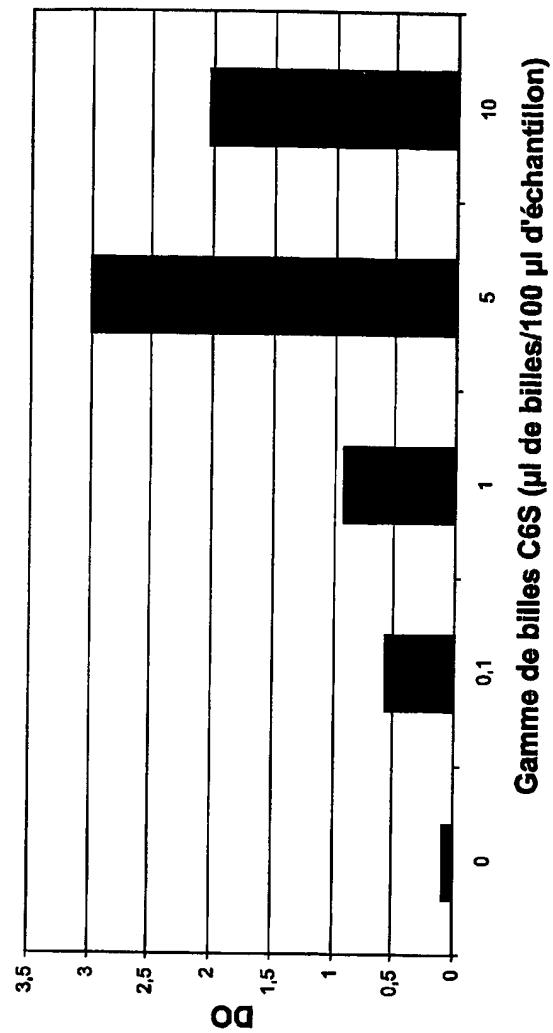
Figure 4 C

4/11

**Figure 5**

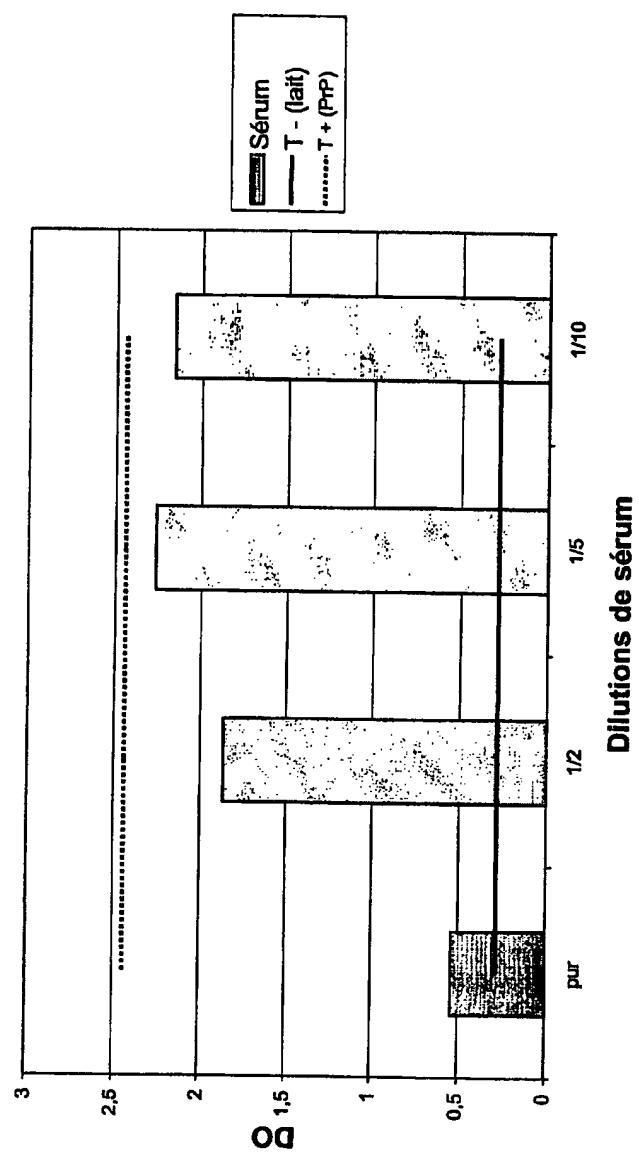
5/11

Figure 6

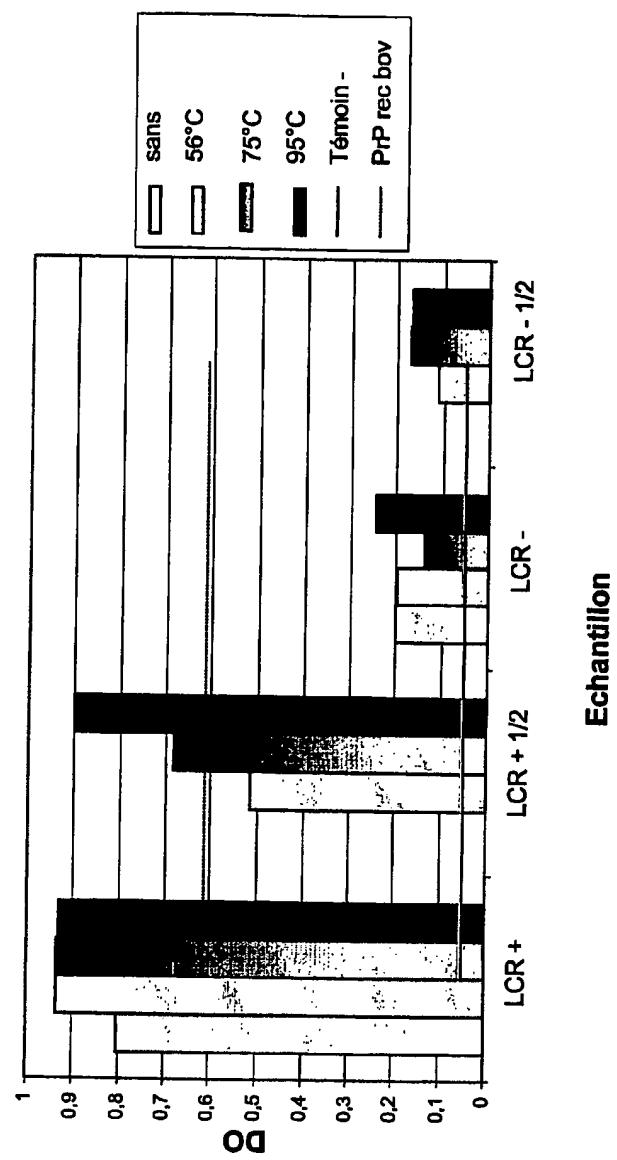


6/11

Figure 7

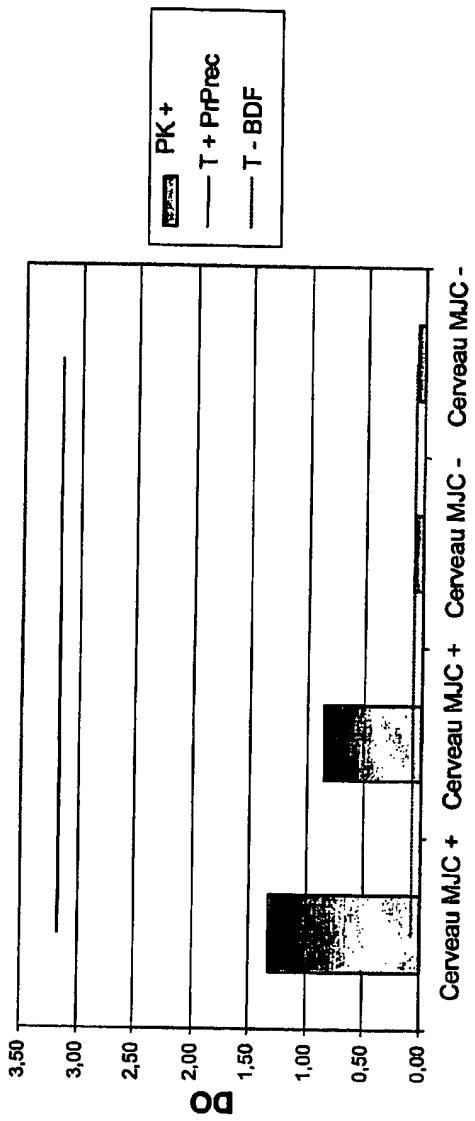


7/11

**Figure 8**

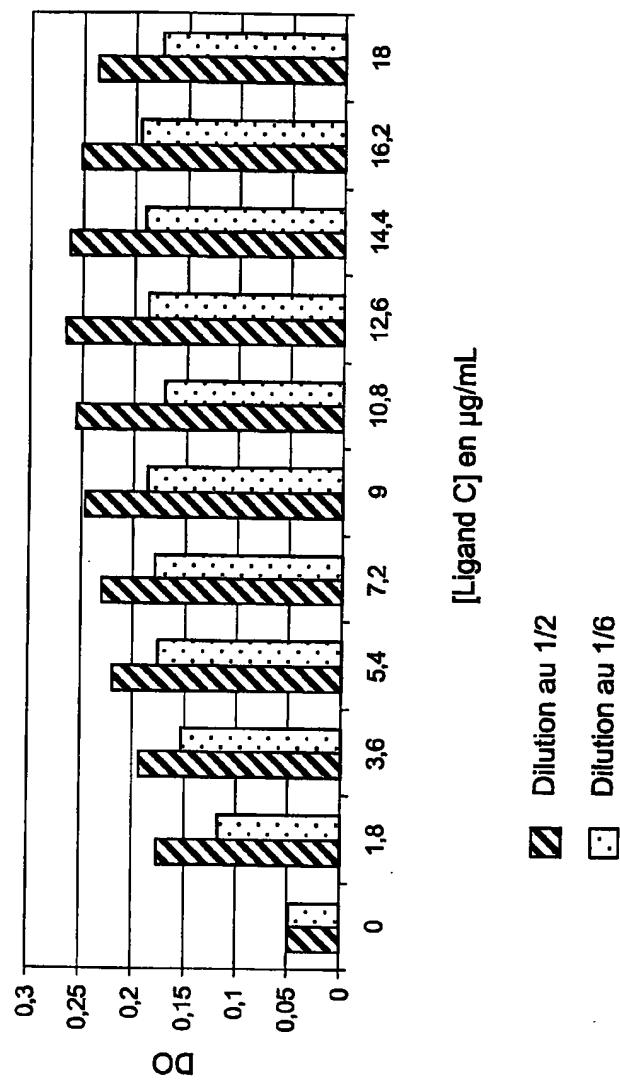
8/11

Figure 9



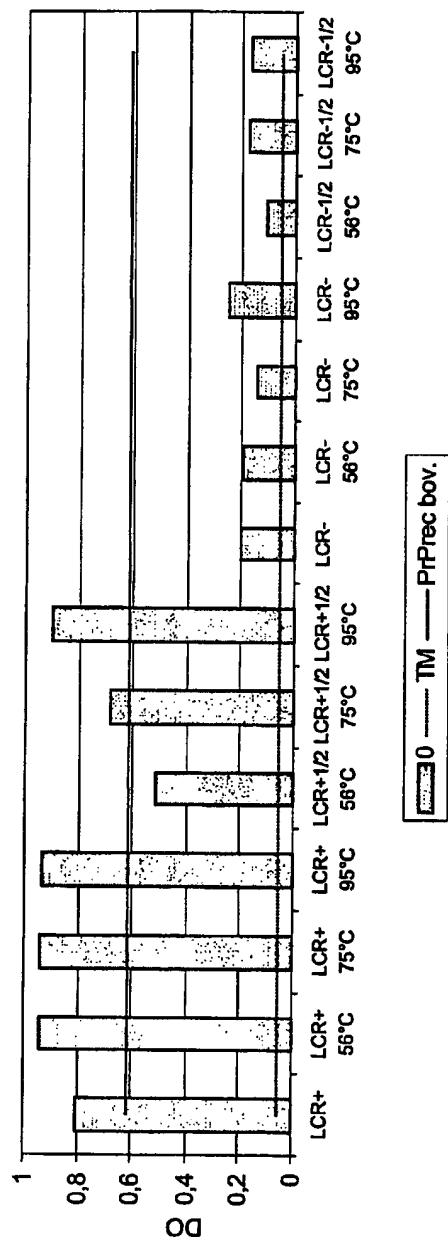
9/11

Figure 10



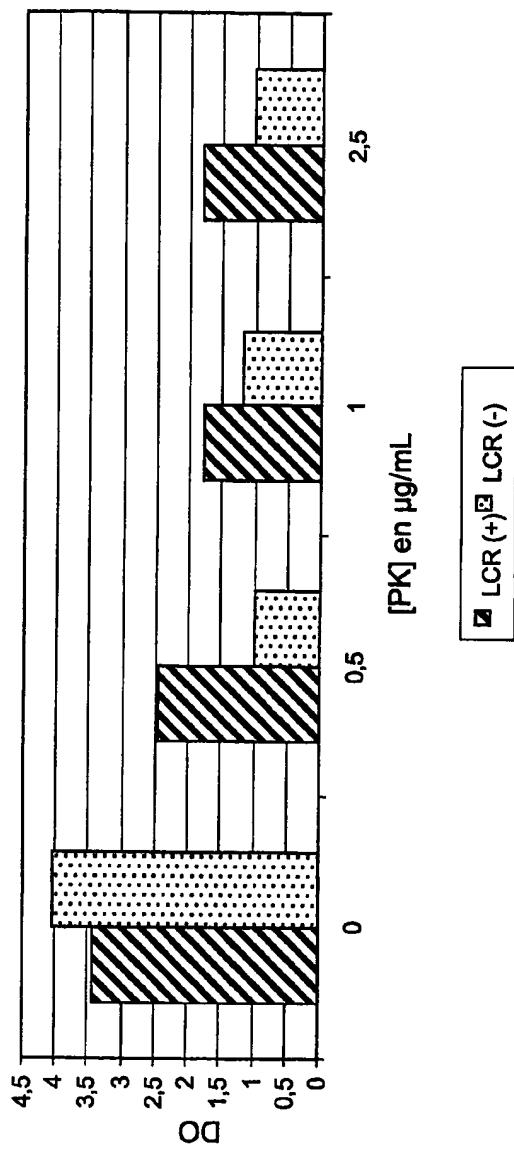
10/11

Figure 11



11/11

Figure 12



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 GO1N33/68 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 GO1N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ;PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 October 2002 (2002-10-31) cited in the application the whole document ---	1
A	WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 April 2001 (2001-04-05) abstract ---	1
A	WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ;CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 October 2001 (2001-10-18) abstract ---	1
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

12 May 2004

Date of mailing of the International search report

25/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03857

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) 5 November 1996 (1996-11-05) abstract	1
X	-----	15
A	WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 October 1997 (1997-10-16) abstract; examples	1,15
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03857

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 02086511	A	31-10-2002	DE CA WO EP	10119713 A1 2437880 A1 02086511 A2 1381868 A2		24-10-2002 31-10-2002 31-10-2002 21-01-2004
WO 0123425	A	05-04-2001	AU CA EP WO JP US US	5241100 A 2385743 A1 1216258 A1 0123425 A1 2003514773 T 2002004586 A1 2001053533 A1		30-04-2001 05-04-2001 26-06-2002 05-04-2001 22-04-2003 10-01-2002 20-12-2001
WO 0177687	A	18-10-2001	AU CA EP JP WO	5135801 A 2405568 A1 1272509 A2 2003530554 T 0177687 A2		23-10-2001 18-10-2001 08-01-2003 14-10-2003 18-10-2001
US 5571911	A	05-11-1996	US WO US	5342934 A 9400455 A1 5599926 A		30-08-1994 06-01-1994 04-02-1997
WO 9737995	A	16-10-1997	AU CA CA EP JP WO US US US	2440997 A 2251072 A1 2391030 A1 0891364 A1 2000511880 T 9737995 A1 6262257 B1 2002026047 A1 2002115566 A1		29-10-1997 16-10-1997 16-10-1997 20-01-1999 12-09-2000 16-10-1997 17-07-2001 28-02-2002 22-08-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la demande Internationale No  
PCT/FR 03/03857

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/68 C12Q1/37

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ; PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 octobre 2002 (2002-10-31) cité dans la demande le document en entier —	1
A	WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ; AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 avril 2001 (2001-04-05) abrégé —	1
A	WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ; CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 octobre 2001 (2001-10-18) abrégé — —/—	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 mai 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/05/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deutsche Internationale No  
PCT/FR 03/03857

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) 5 novembre 1996 (1996-11-05) abrégé -----	1
X		15
A	WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 octobre 1997 (1997-10-16) abrégé; exemples -----	1,15

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No

PCT/FR 03/03857

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02086511	A	31-10-2002	DE 10119713 A1 CA 2437880 A1 WO 02086511 A2 EP 1381868 A2	24-10-2002 31-10-2002 31-10-2002 21-01-2004
WO 0123425	A	05-04-2001	AU 5241100 A1 CA 2385743 A1 EP 1216258 A1 WO 0123425 A1 JP 2003514773 T US 2002004586 A1 US 2001053533 A1	30-04-2001 05-04-2001 26-06-2002 05-04-2001 22-04-2003 10-01-2002 20-12-2001
WO 0177687	A	18-10-2001	AU 5135801 A1 CA 2405568 A1 EP 1272509 A2 JP 2003530554 T WO 0177687 A2	23-10-2001 18-10-2001 08-01-2003 14-10-2003 18-10-2001
US 5571911	A	05-11-1996	US 5342934 A1 WO 9400455 A1 US 5599926 A1	30-08-1994 06-01-1994 04-02-1997
WO 9737995	A	16-10-1997	AU 2440997 A1 CA 2251072 A1 CA 2391030 A1 EP 0891364 A1 JP 2000511880 T WO 9737995 A1 US 6262257 B1 US 2002026047 A1 US 2002115566 A1	29-10-1997 16-10-1997 16-10-1997 20-01-1999 12-09-2000 16-10-1997 17-07-2001 28-02-2002 22-08-2002